

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Isolamento e identificação de microrganismos  
potencialmente patogênicos em leite caprino**

**Carlos Ticiano Coutinho Ramos**

Médico Veterinário

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Isolamento e identificação de microrganismos  
potencialmente patogênicos em leite caprino**

**Carlos Ticiano Coutinho Ramos**

**Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Suzana Aparecida Costa de Araújo**

**Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**2015**

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB

R175i Ramos, Carlos Ticiano Coutinho.  
Isolamento e identificação de microrganismos potencialmente patogênicos em leite caprino / Carlos Ticiano Coutinho Ramos. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2015.  
xvi, 84 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.  
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

Bibliografia.  
Orientador (a): Suzana Aparecida Costa de Araújo.  
Coorientador (a): Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões.

1. Etiologia animal 2. Mastite animal 3. Caprinos leiteiros 4. Staphylococcus I.  
Araújo, Suzana Aparecida Costa de (Orientadora) II. Título.

UFPB/BSAR CDU:636.09(043.3)

**Carlos Ticiano Coutinho Ramos**

**Isolamento e identificação de microrganismos  
potencialmente patogênicos em leite caprino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

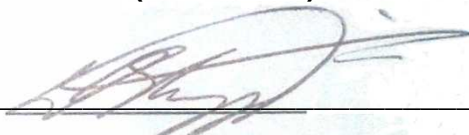
APROVADO EM 20/02/2015.

BANCA EXAMINADORA



---

Profª. Drª. Suzana Aparecida Costa de Araújo  
**(Orientador)**



---

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp  
**(Examinador)**



---

Drª. Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões  
**(Examinador)**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

CARLOS TICIANO COUTINHO RAMOS – Nascido em Campina Grande, Paraíba, ao dia 16 de março de 1984. Concluiu o ensino médio em 2001, no Colégio Estadual Juarez Maracajá em Gurjão-PB. Em 2004 concluiu o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrícola Vidal de Negreiros da Universidade Federal da Paraíba campus III, em Bananeiras. Em 2005, iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos-PB, concluindo em 2009. Nesse período, participou de diversos projetos PIVIC e PROBEX, atuando nas áreas de bioterapia, e nutrição de pequenos ruminantes. Ainda, foi monitor das disciplinas histologia e embriologia veterinária, microbiologia veterinária e anestesiologia e técnicas cirúrgicas. Foi Extensionista Rural na EMATER-PB de 2006 a 2009. Desde 2009, é Técnico em C&T no Instituto nacional do Semiárido – INSA/MCTI.

**DEDICO:**

A Deus,

À minha família, em especial a minha esposa Syduane, pelo imenso amor e por acreditar incondicionalmente nos meus ideais; meus filhos Vinicius e, Laila, que nasceu e Ticiane que foi gerada junto com esse trabalho por, me inspirarem força e coragem para que eu caminhe em busca dos meus sonhos.

**Amo vocês.**

## AGRADECIMENTOS

**À minha esposa, Syduane Moraes a mulher que me completa, me apoia e incentiva em todos os momentos, obrigado. Te amo.**

**Aos meus filhos, Vinicius, Laila e Ticiane, três presentes de Deus, fontes de inspiração, que me fazem acordar todo o dia mais feliz, por ter sido um privilegiado em recebê-los e educá-los para a vida.**

**Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Maria do Socorro, por tudo.**

**Aos meus irmãos Surama, Sumara, Luiz Neto e Teles, pelo carinho, amizade, incentivo em todos os momentos durante esse tempo.**

**A meus avós, Luiz Ramos e Maria das Neves (*in memorian*) por terem sido presentes em minha vida, lembro sempre de vocês.**

**A minha orientadora Professora Suzana, pela suapaciência, orientação, auxílio, e ensinamentos, muito obrigado.**

**A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Tânia Valeska, pelo apoio, gentileza, dedicação, pelos conhecimentos imprescindíveis repassados. Obrigado por tudo.**

**Ao Professor Danilo Sttip, pelas valiosas contribuições ao trabalho.**

**Ao Professor Walter Esfraim Pereira, pelo auxílio com as análises estatísticas.**

**Aos colegas do INSA, Amilton Júnior e Paulo Santos pela força e compreensão, durante os momentos que foram necessários me ausentar.**

**Ao Diretor do INSA, Inácio Hernan Salcedo pelo apoio e compreensão**

neste novo momento da minha vida.

**Aos Coordenadores de Pesquisa e Administrativo do INSA, Aldrin Peres Martin Marin e Salomão Medeiros de Sousa pelo incentivo.**

**Aos colegas Mauro, André, Carla, Ayhodya, Manoela, Mariane, Michele, Rodrigo, Candice, Geovania, Camila, Andreia, Silvana, pelos momentos que compartilhamos de tensões e de felicidades.**

**A Kênia, Arnaldo Júnior, Igor, Barbara e Silvio pelo apoio nas análises laboratoriais.**

**Aos proprietários, que abriram seus lares e propriedades para o bem da pesquisa e progresso da região.**

**A Ana Claudia e Jaldir pela presteza de sempre na secretaria do PPGCAn.**

**A todos os professores da PPGCAn do Centro de Ciências Agrárias da UFPB.**



## Sumário

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>18</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>19</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO GERAL . .....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO I :Etiologia e fatores de risco associada à mastite subclínica caprina no semiárido paraibano .....</b>	<b>28</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>29</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>30</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>30</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>31</b>
<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>36</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPITULO II:Identificação e isolamento de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa proveniente de leite caprino por PCR .....</b>	<b>44</b>

<b>Introdução.....</b>	<b>46</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>48</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>51</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>51</b>
<b>Referências .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Análise univariada dos fatores de risco associados à mastite caprina em rebanhos do semiárido Paraibano.....	39
Tabela 2. Associação de achados microbiológicos e o teste CMT e associação de achados microbiológicos e o da caneca amostras de leite de cabras, no semiárido paraibano.....	40
Tabela 3. Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em cultura pura de amostras de leite de cabras com mastite subclínica, cariri paraibano.....	41
Tabela 4. Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em associação de amostras de leite de cabras com mastite subclínica, no cariri paraibano.....	42
Tabela5. Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em cultura pura e em associação de amostras de leite de cabras com mastite subclínica, cariri paraibano.....	43

## LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Primers utilizados no estudo.....	57
Quadro 2. Associação dos resultados encontrados no CMT, caneca, microbiológico e PCR 16SrDNA .....	58

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<p>Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR utilizando primers 16sRNA,  a.1 - Marcador de 100 bp - Norgen 11500 2 vazio, 3- amostra 9d, 4-  amostra 59d, 5- amostra 39E, 6- amostra 45E, 7- amostra 142E, 8-  amostra BHI, 9- branco "água ultrapura + Mix", 10- branco "só água  ultrapura" , 11 – vazio12-vazio.b. 1 - Marcador de 100 bp - Norgen  11500, 2- vazio, 3- amostra 9d, 4- amostra 59d, 5- amostra 39E, 6-  amostra 45E, 7- amostra 142E, 8- amostra BHI, 9- branco "água  ultrapura + Mix" ,10- branco "só água ultrapura", 11 – vazio, 12-  vazio.....</p>	56

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS EM LEITE CAPRINO

**RESUMO GERAL** - A mastite subclínica caprina ocasiona prejuízos econômicos em decorrência do descarte, dos gastos com medidas terapêuticas e da redução da quantidade e qualidade do leite e seus derivados. Este trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência, a etiologia da mastite subclínica e identificar *Estafilococcus* coagulase negativo (ECN) por PCR bem como identificar a presença de ECN resistente a meticilina ou com produção de biofilme além de, constatar os fatores de risco associados à infecção. Nesse estudo, 372 amostras de leite de cabra *in natura* a partir de 186 animais, provenientes de 10 propriedades leiteiras no estado da Paraíba, foram avaliadas pelo teste da caneca telada, *California Mastitis Test* (CMT) e exame bacteriológico. Após o resultado do microbiológico, as 24 amostras de leite que apresentaram apenas ECN foram encaminhadas ao laboratório de Biologia molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros para a extração de DNA diretamente do leite. Os fragmentos contendo os genes de interesse foram amplificados, a partir de DNA genômico de cepas isoladas, por PCR utilizando-se os primers específicos para a amplificação dos genes em estudo. No teste da caneca rastreados e CMT, 3,22% e 43,90% das amostras foram positivas, respectivamente. No exame bacteriológico, 19,35 % para o número de glândulas e 38,70 % das cabras foram positivas e o patógeno mais frequente entre isolados puros ou em associação foi *Staphylococcus* coagulase negativa (28,25%). Fazer limpeza frequente nas instalações, isolar animais doentes, possuir sala de ordenha e higienização dos tetos antes da ordenha foram os maiores riscos associados à infecção da glândula mamária em cabras leiteiras. Baseado neste estudo pode-se ampliar o estudo da etiologia da mastite caprina subclínica, possibilitando realizar extrações diretamente do leite e com amostras apresentando diferentes tipos de bactérias.

**Palavras-chave:** etiologia, mastite caprina, PCR, *Staphylococcus* coagulase negativa.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POTENTIALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS IN GOAT MILK

**ABSTRACT** - The goats subclinical mastitis causes economic losses due to disposal, spending on therapeutic measures and reducing the quantity and quality of milk and its derivatives. This study aimed to determine the incidence, etiology of subclinical mastitis and identify coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) by PCR and identify the presence of ECN methicillin resistant or biofilm production beyond, note the risk factors associated with infection. In this study, 372 samples of goat milk fresh from 186 animals from 10 dairy farms in the state of Paraíba, were evaluated by testing the screened mug, California Mastitis Test (CMT) and bacteriological examination. After the results of the microbiological, the 24 milk samples showed that *Staphylococcus* coagulase negative were sent to the molecular biology laboratory of the Embrapa Coastal Tablelands for DNA extraction directly from milk. The fragments containing the genes of interest were amplified from genomic DNA isolated strains by PCR using primers specific for the amplification of genes in study. In the test the screened mug and CMT, 3.22% and 43.90% of the samples were positive, respectively. In bacteriological examination, 19.35% for the number of glands and 38.70% of the goats were positive and the most common pathogen among pure alone or in combination was coagulase negative *Staphylococcus* (28.25%). Make frequent cleaning the premises, isolate sick animals, have milking parlor hygiene and ceilings before milking were the biggest risks associated with infection of the mammary gland of goats. Based on this study can further the study of the etiology of subclinical mastitis goat, allowing perform extractions directly from milk samples and presenting different types of bacteria.

**Keywords:** etiology, caprine mastitis, PCR, coagulase-negative *Staphylococcus*.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caprinocultura leiteira no Brasil vem se consolidando como atividade rentável, que não necessita de muitos investimentos e/ou grandes áreas para o seu desenvolvimento. Por estes motivos, a caprinocultura leiteira é uma das atividades mais indicadas para geração de emprego e renda no campo, especialmente nos programas de fortalecimento da agricultura familiar (HOLANDA JUNIOR, et al. 2008).

A contribuição desta atividade para o crescimento econômico e o desenvolvimento social é significativa, haja vista que a atividade tem sido responsável por melhorias significativas nos índices de desenvolvimento humanos (IDH) das regiões onde está situada. Não obstante sua importância social e econômica, a atividade ainda é considerada uma das mais viáveis para as condições do nordeste brasileiro, em que os índices pluviométricos são baixos e a distribuição da chuva é muito concentrada e irregular, com longos períodos de estiagem (GUIMARÃES, et al. 2009).

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo indicado inclusive para indivíduos que sofrem de problemas digestivos e que não toleram o leite bovino. Com o aprimoramento da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem surgido uma maior preocupação com a qualidade do leite, o que requer o controle de alguns fatores que possam alterar suas características, e o principal deles é a mastite (LANGONI et al. 2006). Dentre as doenças que acometem o rebanho leiteiro e compromete a qualidade do leite, a mastite ocupa lugar de destaque por possuir importância econômica e saúde pública. Além de ser de difícil controle (PYORALA, 2002).

A mastite se define por uma inflamação na glândula mamária, caracterizada pelo aumento de células somáticas, como também por mudanças físico-químicas e microbiológicas do leite. Condições de higiene, lesões advindas de ordenha manual ou mecânica favorecem a penetração de patógenos na glândula mamária por via hematogênica ou via teto, constituem algumas das causas de mastite. Embora a mastite possa ser causada por agentes físicos ou químicos, suas causas são principalmente por agentes bacterianos (BURGOS, 2009).



Mastite subclínica em caprinos é principalmente de origem bacteriana e os estafilococos coagulase negativa (ECN) são os agentes etiológicos predominantes para mastite subclínica em caprinos.

A prevalência do ECN, caprina mastite subclínica varia entre 60% e 80,7% (CONTRERAS et al, 2003;. DA SILVA et al., 2004; MORONI et al., 2004; HALL e RYCROFT, 2007).

Dentre as espécies de ECN mais prevalentes, em ovinos tem-se em ordem decrescente de importância: *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* e *S. simulans*, como as espécies com maior frequência de isolamento. Com relação à espécie caprina, pesquisas demonstram maior ocorrência de *S. caprae*. Entre as espécies de ECN, *S. epidermidis* está associada, na maioria das vezes, com elevadas contagens de células somáticas (CCS) em ovelhas e cabras, não sendo o mesmo fato observado para o *S. caprae* (BERGONIER et al. 2003, OLECHNOWICZ & JAŚKOWSKI, 2014).

Estudos recentes em várias regiões do Brasil corroboram tais afirmações. Em Botucatu-SP analisando amostras de leite caprino com mastite subclínica, Langoniet al. (2006), constataram que os microrganismos isolados com maior frequência foram: *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. aureus* e *C. bovis*, representando 50,0% (33/60), 13,6% (3/19), 11,4% (2/16) e 8,6% (1/12), respectivamente. Já no estado da Bahia, Peixoto et al., (2012) verificaram que os microrganismos mais frequentemente isolados de leite de cabras pertencem ao gênero *Staphylococcus* 77,11% (91/118). Enquanto, na Paraíba, Neves et al. (2013), também verificaram que os SCN participam ativamente nos casos de mastite subclínica de cabras leiteiras.

As principais medidas que compõem um Programa Básico de Controle da Mastite segundo Chapavalet al., (2009), são: tratar no período seco, todas as cabras; ao surgimento de um caso clínico, tratar imediatamente; manter o funcionamento adequado do sistema de ordenha; implantar um correto manejo de ordenha, principalmente na desinfecção dos tetos após a ordenha; em casos de mastite crônica devem-se descartar os animais; e a boa higiene e conforto na área de permanência dos animais.

De acordo com Neves et al., (2010), o conhecimento dos diferentes fatores que contribuem para a maior ocorrência da mastite é de grande importância para se

eleger estratégias adequadas de prevenção e controle, pois, estudos voltados para os aspectos epidemiológicos das enfermidades são bastante relevantes, sendo o ponto de partida para a adoção de medidas sanitárias da propriedade (PEIXOTO et al., 2011).

O diagnóstico da mastite auxilia no tratamento e no controle do quadro infeccioso, podendo ser realizado por diversos métodos (ALMEIDA, 2004; ANDERSON et al., 2005) tais como inspeção e palpação da glândula mamária, exame físico do animal, avaliação macroscópica do leite através do teste de tamis ou teste da caneca de fundo preto, exame indireto através do Califórnia mastite teste (CMT) e análise do perfil microbiológico do leite seguido de antibiograma (ALMEIDA, 2004).

Entre 15 a 40% das amostras de leite de casos de mastite clínica podem dar resultados negativos após cultivo microbiológico, mesmo quando a coleta e os métodos de isolamento são aplicados de maneira correta (BARTELETT et al., 1992; OLDE REIKERINK et al., 2008). O não isolamento do agente da mastite nestes casos pode ser por diversos motivos. Dentre estes, citam-se a eliminação espontânea da infecção, a baixa concentração dos patógenos no leite, o padrão de eliminação dos microrganismos, que pode alternar entre números elevados e mais baixos, a localização intracelular de determinados patógenos e a presença de substâncias inibitórias no leite. Os resultados negativos são reduzidos, mas não são eliminados quando se empregam técnicas que procuram aumentar as chances de isolamento.

Atualmente, há uma busca constante por técnicas diagnósticas mais sensíveis, específicas e que apresentem resultados rápidos para diversos tipos de agentes e doenças impulsiona a pesquisa. E no caso dos agentes causadores da mastite vem-se estudando o uso da Reação em cadeia da polimerase na identificação dos seus agentes.

Através da técnica de Repetitive Extragenic Palindromic - REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de vacas, Chapaval et al. (2006; 2010) rastrearam o *Staphylococcus aureus* na linha de produção de leite, analisando as mãos dos ordenhadores, teteiras, úbere dos animais e leite *in natura* como veículos de contaminação. Enquanto, Olivindo et al., (2009) aplicaram esta técnica no

monitoramento da qualidade do leite de cabra por meio da detecção de *Staphylococcus aureus*. Com a mesma técnica molecular Peixoto et al., (2010) estudaram a dinâmica da resistência de *S. epidermidis* aos antimicrobianos no estado do Pernambuco.

Em relação ao tratamento, quando identificado o problema nos rebanhos pelos produtores, geralmente sem orientação de Médicos Veterinários capacitados, apenas de balconistas de Farmácias, adquirem e fazem uso indiscriminado de antibióticos. Tal prática tem acarretado em resistência antimicrobiana e, conseqüentemente se tornado um problema tanto para animais como para humanos (CONTRERAS et al., 2007).

O uso de antibióticos ou outras drogas de bovinos em pequenos ruminantes, ou até mesmo o uso de produtos indicados para ovinos em caprinos, constituem um alto risco devido à segurança e eficácia destes produtos em cada espécie, por serem em grande parte desconhecidos (MAVROGIANNI et al., 2004). Estudo desenvolvido por Bjorland et al., (2005), demonstrou a distribuição de genes da resistência associado a *Staphylococcus* spp. em leite de vacas e cabras. Nesse sentido, poucas drogas são especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, particularmente em cabras.

A detecção de cepas de *S. aureus* resistentes aos aminoglicosídeos deve ser considerada uma preocupação para saúde pública, dado ao mecanismo de resistência similar encontrado em cepas isoladas em humanos (GONI et al., 2004).

Os ECN estão entre os principais microrganismos emergentes como patógenos nosocomiais, que desenvolvem resistência para a maioria dos antimicrobianos disponíveis e são comuns em pacientes hospitalizados. A emergência desse microrganismo limitou o arsenal terapêutico, aumentando o risco de fracasso na terapêutica (ROSA, 2008).

Em vários isolados de ECN foi detectado o gene *mecA*, que determina a resistência para  $\beta$ -lactâmicos, em estudos de vigilância em diferentes países da Europa, a taxa de resistência dos ECN a oxacilina está em 70 a 80%, semelhante as que são informadas nos Estados Unidos, Canadá e América Latina (ROSA, 2008).

## OBJETIVO GERAL

Padronizar um diagnóstico molecular da mastite subclínica, utilizando PCR, para identificação de *Staphylococcus* sp. proveniente de leite caprino, bem como, constatar a ocorrência da mastite caprina no cariri, região semiárida da Paraíba.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais agentes causadores de mastite caprina subclínica por diagnóstico microbiológico;
- Detectar o *Staphylococcus* spp. por PCR diretamente do leite;
- Extrair o DNA bacteriano de amostras de leite contaminado e de isolado de cultura;
- Padronizar PCR para DNA extraído de amostras de leite e isolado;
- Identificar a presença de ECN resistente a meticilina ou com produção de biofilme;
- Conhecer os fatores de risco associados à mastite caprina na região de estudo;

## **CAPITULO I**

### **ETIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADA À MASTITE SUBCLÍNICA CAPRINA NO SEMIÁRIDO PARAÍBANO**

Este manuscrito está formatado de acordo com as normas do periódico

**Semina: Ciências Agrárias**

**Etiologia e fatores de risco associados à mastite subclínica caprina no semiárido Paraibano**  
**Etiology and risk factors associated with subclinical mastitis in goats in the semiarid of Paraíba**

Carlos Ticiano Coutinho Ramos<sup>1</sup> Suzana Aparecida Costa de Araújo<sup>2</sup> Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões<sup>3</sup> Kênia Moura Teixeira<sup>3</sup> Arnaldo Santos Rodrigues Junior<sup>3</sup> Syduane Moraes Leite Ramos<sup>4</sup>

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi estudar os agentes etiológicos e os fatores de risco associados à mastite subclínica caprina no cariri, região semiárida da Paraíba. Nesse estudo, foram coletadas 372 amostras de leite de cabra *in natura* a partir de 186 animais, provenientes de 10 propriedades leiteiras no Estado, sendo analisadas pelo teste da caneca telada, *California Mastitis Test* (CMT) e exame bacteriológico. No teste da caneca telada e no CMT, 3,22 % e 43,90 % das amostras foram positivas, respectivamente. No exame bacteriológico, 19,35 % para o número de glândulas e 38,70 % das cabras foram positivas e o patógeno mais frequente entre isolados puros ou em associação foi *Staphylococcus coagulase negativa* (28,25%). Observou-se a presença de mastite subclínica e o seu principal patógeno foi o *Staphylococcus coagulase negativa*. Observou-se a presença de mastite subclínica e o seu principal patógeno foi o *Staphylococcus coagulase negativa*. Fazer limpeza frequente nas instalações, isolar animais doentes, possuir sala de ordenha e higienização dos tetos antes da ordenha foram os maiores riscos associados à infecção da glândula mamária, ou seja, nas propriedades que realizaram estas práticas houve uma maior taxa da infecção subclínica da glândula mamária.

**Palavras chaves:** agentes etiológicos, leite de cabra, mastite, *Staphylococcus spp.*

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-PPGCAn da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. Instituto Nacional do Semiárido-INSa. Av. Francisco Lopes de Almeida, 58434-700, Campina Grande, PB, Brasil. ticianoramos@hotmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. suzanaaraujo@gmail.com

<sup>3</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros Av. Beira Mar, 3250 Jardins, 49025-040, Aracaju, SE. tania.dantas@embrapa.br, juuniorjr@bol.com.br, kenia.teixeira@embrapa.br

<sup>4</sup>Veterinária autônoma. syduane@hotmail.com

**Abstract:** The objective of this work was to study the etiologic agents and risk factors associated with subclinical mastitis goats in region cariri, semiarid region of Paraíba. In this study, we collected 372 samples of goat milk fresh from 186 animals from 10 dairy farms in the state, being analyzed by testing the screened mug, California Mastitis Test (CMT) and bacteriological examination. In the test the screened mug and CMT, 3.22% and 43.90% of the samples were positive, respectively. In bacteriological examination, 19.35% for the number of glands and 38.70% of the goats were positive and the most common pathogen among pure alone or in combination was coagulase negative *Staphylococcus* (28.25%). We observed the presence of subclinical mastitis and its main pathogen was *Staphylococcus* coagulase negative. Make frequent cleaning the premises, isolate sick animals, has teats milking and cleaning room before milking were the biggest risks associated with infection of the mammary gland, in the properties that made these practices there was a higher rate of subclinical infection of the gland breast.

**Key words:** etiologic agents, goat milk, mastitis, *Staphylococcus*.

### Introdução

O leite de cabra tem sido bastante utilizado como alternativa para alimentação de crianças e adultos sensíveis ou alérgicos ao leite de vaca e sua qualidade é definida por seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos com o objetivo de fixar condições de produção, identidade e requisitos mínimos de qualidade para consumo (Almeida et al., 2013).

A mastite consiste na inflamação da glândula mamária e caracteriza-se por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, e por distúrbios patológicos do tecido glandular. É uma das enfermidades mais comuns e importantes em rebanhos de caprinos leiteiros, pois, acarreta enormes prejuízos econômicos à produção leiteira, decorrente da redução da quantidade ou perda total da capacidade secretora da glândula mamária e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido para a fabricação de produtos derivados. E, sob o ponto de vista da saúde pública, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite ou derivados lácteos contaminados por microrganismos patogênicos (Fagundes & Oliveira, 2004).

É uma doença multifatorial, ocasionada por fatores ambientais e de manejo que propiciam condições favoráveis para instalação de agentes infecciosos (Peixoto, et al. 2010). Dentre os vários microrganismos que causam a infecção, os de origem bacteriana assumem destaque. As bactérias do gênero *Staphylococcus*, têm sido apontadas como os principais patógenos responsáveis pela mastite intramamária em caprinos (Coutinho et al., 2006; Langoni et al. 2006, Mota, 2008; Bolsanello et al., 2009). Neste gênero, os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) são os mais prevalentes patógenos causadores de mastite subclínica em ruminantes leiteiros, provavelmente em virtude do comportamento oportunista deste gênero nas infecções mamárias, favorecido pela sua manutenção

como agente da microbiota da pele e úbere de animais domésticos (Coutinho et al., 2006). Embora menos patogênico que *S. aureus*, os SCN podem também produzir mastite subclínica persistente, significativo aumento na Contagem de células somáticas (CCS), causarem mastite clínica (Contreras et al., 1997), bem como, produzir enterotoxinas termoestáveis (Udo et al., 1999).

Contudo, apesar da reconhecida importância dessa bactéria como maior causadora de infecções intramamária em pequenos ruminantes, a patogenicidade de diferentes espécies de SCN é variável. Esta patogenicidade também é associada à aderência, pois estes microrganismos têm grande poder de adesão, produção de enzimas extracelulares e toxinas capazes de provocar níveis elevados de lesão tecidual (Mota, 2008).

Em cabras e ovelhas os patógenos mais frequentemente isolados entre o CNS foram *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* e *S. simulans*. Em cabras a espécie mais prevalente é *S. caprae*. (Olechnowicz & Jaśkowski, 2014). Destes, o *Staphylococcus epidermidis* e *S. caprae* estão entre os mais prevalentes patógenos da mastite em cabras e *S. epidermidis* e *S. xylosus* em ovelhas.

O diagnóstico clínico de mastite é feito baseando-se nos sintomas clínicos, isto é, sinais visíveis da inflamação, como dor, em um ou mais quartos, recusa à ordenha, e leite com sangue, pus, flocos, ou dessorando. Entretanto, mastites subclínicas ou casos crônicos não são diagnosticados pelos métodos rotineiros de exame clínico: inspeção do animal, leite e palpação (Radostits et al., 2007).

As frequências de mastite clínica e subclínica são parâmetros consagrados na avaliação da sanidade da glândula mamária. Logo, constituem os primeiros a serem considerados para a implantação de um programa de controle da mastite. Além disso, análises microbiológicas são complementares e indispensáveis em um programa de controle desta enfermidade, por possibilitarem o isolamento e a identificação do seu agente etiológico (Bueno et al., 2003).

Tendo em vista, a importância desta afecção, o interesse pela caprinocultura e a escassez de trabalhos científicos atuais, estudou-se a ocorrência, os agentes etiológicos e os fatores de risco associados à mastite subclínica caprina no cariri, região semiárida da Paraíba.

### **Material e métodos**

Neste estudo foram avaliadas 372 amostras de leite de 186 cabras, obtidas em 10 propriedades localizadas nos municípios de Gurjão, Santo André, São João do Cariri, Parari e Taperoá, região semiárida do estado da Paraíba em janeiro de 2014. Os rebanhos eram constituídos de animais sem padrão de raça definida (SPRD), puros e/ou mestiços das raças Saanen e Parda Alpina, sem sintomatologia clínica de mastite, em diferentes idades e estágios de lactação, submetidos à ordenha tipo manual, em sala adequada ou não. As propriedades caracterizavam-se por utilização da mão de obra familiar.

Na ocasião da visita às propriedades, um questionário epidemiológico foi aplicado com a



finalidade de caracterizar o problema a partir das seguintes informações: ocupação principal, tipo de criação e exploração, procedimentos de manejo sanitário como: limpeza de frequente do curral, isolamento de animais doentes, limpeza e desinfecção da sala de ordenha, uso de pré e pós ‘dipping’, limpeza dos tetos, secagem, esterilização de material.

Antes da coleta das amostras de leite realizou-se a assepsia dos tetos, utilizando-se álcool a 70%, que posteriormente eram secos com papel toalha descartáveis. O diagnóstico de mastite clínica foi realizado por exame clínico do animal, da glândula mamária e análise dos três primeiros jatos em caneca de fundo escuro para observação de grumos coágulos, pus sangue ou leite aquoso. Para diagnóstico da mastite subclínica foi aplicado o California Mastitite Teste (CMT), em cada metade mamária seguindo as orientações do fabricante. Escores aritméticos foram atribuídos as diferentes reações do CMT, sendo 0, para reações negativas, 1+ (fracamente positivas), 2+ (positivas), 3+ (fortemente positivas determinadas pela viscosidade formada entre o reagente e o leite).

Para o exame bacteriológico, foram coletados 40 mL de leite em frascos estéreis por cada metade mamária, acondicionados em caixa isotérmicas com gelo e transportados para um ponto de apoio no município de Gurjão, PB, posteriormente foram encaminhadas congeladas ao laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

No Laboratório foram cultivadas 10 microlitros, simultaneamente em ágar base enriquecido com 8% de sangue ovino, Agar Edwards enriquecido com 8% de sangue de carneiro, Agar sal manitol e Agar MacConkey, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C em aerobiose, realizando-se leituras após 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo observadas as características de crescimento e produção de hemólise.

Nos microrganismos isolados foram realizados exames bacterioscópicos pelo método de Gram e submetidos às provas de identificação. As provas utilizadas foram: produção de catalase, coagulação de plasma de coelho, VP(Voges-Proskauer), oxidação-fermentação, NaCl 6,5%, hipurato de sódio, teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), esculina, biliesculina, urease, indol, motilidade em ágar semi-sólido, produção de H<sub>2</sub>S, crescimento em TSI (Três açúcares e Ferro), ágar citrato de Simmons, VM/VP(Vermelho de Metila/ Voges-Proskauer) e de, E.M.B(Agar Eosina Azul de Metileno), gelatina, amido, e NaCl 9,5%.

Foram consideradas amostras positivas ao isolamento microbiano as que apresentaram crescimento. Quando houve o isolamento de três ou mais micro-organismos, considerou-se como contaminadas.

Para identificação dos agentes bacterianos, observou-se as características morfofotintoriais das colônias através da técnica de coloração de Gram, além da realização de provas bioquímicas e taxonômicas, de acordo com Quinn et al., (1994), e com base no Manual de Microbiologia Clínica (Murray et al., 2004).

Para a análise dos fatores de risco associados à mastite subclínica foram utilizados os dados obtidos com os questionários epidemiológicos aplicados nas propriedades. Realizou-se estudo descritivo das variáveis investigadas determinando a frequência. A análise dos fatores de risco foi efetuado análise univariada, onde cada variável independente foi cruzada com a variável dependente (condição sanitária do animal). Um animal foi considerado positivo quando foi positivo no exame microbiológico. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Analysis System, SAS 9.4. (2013).

### **Resultados e discussão**

Das 10 propriedades visitadas, a caprinocultura era a principal atividade em quatro delas (40%). Apresentava uma criação do tipo leiteira em sete (70%) e em nove (90%) a exploração era do tipo semi-intensivo. Dados similares foram encontrados em propriedades de ovinos de corte no Paraná-Brasil (Pereira et al, 2014). Ambos os fatores não influenciaram para a ausência ou presença de mastite (Tabela 1).

Com relação ao manejo sanitário, observou-se que apenas três (30%) propriedades faziam limpeza do curral e estas pertenciam aos municípios de Santo André e Parari. Sete (70%) faziam isolamento dos animais doentes. Apenas na região de Gurjão nenhuma das duas propriedades tem essa prática.

Em Santo André verificou-se por meio dos questionários que nas duas propriedades, os criadores de cabra faziam todas as medidas sanitárias, como limpeza do curral, isolamento dos animais doentes, limpeza e desinfecção da sala de ordenha, higienização de utensílios de ordenha, uso de pré e pós ‘dipping’, realizava secagem, esterilizavam o material de aplicação de medicamentos, faziam limpeza dos tetos e tratavam os animais ao observar qualquer alteração no leite ou teto. Apesar de todo o manejo, as propriedades estudadas deste município apresentou a maior porcentagem de positividade no microbiológico (19%).

Considerando que as informações foram obtidas por questionário e não foi perguntado como era realizado o procedimento, pode-se ressaltar que, para ser efetivo, o pré-‘dipping’ deve ser feito corretamente.

Na análise dos fatores de risco para a mastite subclínica, as variáveis associadas com a probabilidade de resultado positivo foram: fazer limpeza frequente nas instalações ( $p<0,0001$ ), isolar animais doentes ( $p<0,0001$ ), esterilizar material de aplicação de injeções ( $p=0,0065$ ), possuir sala de ordenha ( $p<0,0001$ ), higienizar sala e utensílios de ordenha ( $p<0,0001$ ), Fazer limpeza e higienização nos tetos antes da ordenha ( $<0,0001$ ), fazer uso de pré e pós ‘dipping’ ( $p=0,0001$ ), (Tabela 1).

Diferentemente do encontrado por Neves et al. (2010), em pesquisa realizada na Paraíba, que identificaram como fatores de risco associados à mastite subclínica além do não isolamento dos

animais doentes, a caprinocultura não ser a atividade principal da propriedade e por Gomes et al. (2014), em São Paulo que constatarem os fatores de risco para a infecção mamária, quando não era atividade principal, quando não se fazia o teste da caneca, quando o cloro não era utilizado na limpeza dos tetos, limpeza inadequada da sala de ordenha, higiene inadequada no processo de ordenha, higiene inadequada do ordenhador.

Das 372 amostras de leite analisadas pelo CMT, 77,16 % (287/372) reagiram ao teste. Estas apresentaram a seguinte distribuição: escore 1+ (n=123; 33,06%), 2+ (n=128; 34,40%), 3+ (n=36; 9,70%), enquanto, 22,84 % (85/372) foram consideradas negativas. Entretanto, apenas os escores 2+ e 3+ foram considerados como infecção subclínica, em razão da presença maior de células somáticas no leite dessa espécie (Mota, 2008). As 164 amostras consideradas positivas no CMT, apenas 43,90 % (72/164) apresentaram crescimento bacteriano (tabela 2), das quais, 1,21% (2/164) houve crescimento de mais de dois microrganismos, considerou-se contaminada e 56,10 % mostraram-se negativas. Estas culturas negativas podem estar relacionadas, provavelmente, com o tempo de congelamento das amostras até ser analisado ou o transporte até o laboratório, terem produzidos falsos negativos.

Resultados similares foram encontrados por Melo, (2012) estudando mastite em cabras na Paraíba, demonstrando que o CMT não é um teste diagnóstico satisfatório para validar infecções intramamária em caprinos. Um baixo escore do CMT tem sido sugerido como bom indicador de ausência de infecção intramamária em cabras, entretanto, um alto escore nem sempre indica infecção nesta espécie animal, uma vez que as células epiteliais reagem ao CMT juntamente com os leucócitos, causando uma interpretação diferente da usada para bovinos (Perrin et al., 1997).

Verifica-se que no exame microbiológico que houve crescimento bacteriano em 19,35% (72/372) das amostras das metades mamárias, no entanto, significa uma frequência da mastite subclínica nos rebanhos estudados uma taxa de 38,70% (72/186). Pesquisas em rebanhos de caprinos leiteiros revelam a ocorrência de mastite em 13 a 15% das cabras lactantes (Anderson et al., 2005), sendo que até 37% dos animais do rebanho podem apresentar mastite subclínica (Silva et al., 2005). Neste sentido, os resultados obtidos neste estudo apresentam um pouco acima da taxa considerada normal. Estudos realizados por Neves et al. (2010) na mesma região, observaram índices bem abaixo, de mastite subclínica em cabras leiteiras (11,49%).

À proporção de isolados positivos encontrados neste trabalho foi maior na glândula esquerda (53,06%) em relação à direita (46,94%), corroborando com os resultados observados por Cavalcante et al. (2013) em um trabalho na Bahia. Não há na literatura justificativa para isto, porém, coincidentemente é o lado em que as cabras são ordenhadas. A prevalência da mastite subclínica unilateral (67,12 %) foi maior quando comparada com a bilateral (32,88%).

No teste da caneca de fundo escuro (tabela 2), 3,22% (6/186) das cabras apresentaram mastite clínica em uma das metades mamárias, destas 66,66% (4/6) na glândula mamária esquerda. Estes

animais eram oriundos de apenas quatro propriedades, sendo que em duas a ordenha era realizada em uma plataforma de alvenaria dentro de uma sala da qual, em um destes criatórios foram identificados três animais positivos, enquanto as demais a ordenha era feita no chão do próprio curral. De acordo com Contreras et al. (2007) os resultados obtidos para a mastite clínica no presente estudo está dentro dos níveis esperados, abaixo dos 5%. Em estudo anterior realizado na região, Bianchini et al. (2010), observaram uma ocorrência de mastite clínica de 0,30% (1/327) pelo mesmo teste. Já Almeida et al. (2013), estudando agentes etiológicos da mastite em rebanhos de Minas Gerais e Rio de Janeiro constataram uma frequência de 3,1% (2/64).

Em sua maioria as mastites foram causadas por um único agente etiológico 78,58 % (55/70), por outro lado, em 21,42 % (15/70) das infecções mamárias houve infecção mista.

Os resultados do isolamento de microrganismos em cultura pura e em associação podem ser observados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Na Tabela 3 pode ser observado que os microrganismos isolados em cultura pura foram: *Streptotoccus bovis* (29,10%), *Staphylococcus coagulase negativa* (25,45%), *Clostridium ulcerans* (21,81%), *Staphylococcus intermedius* (7,27%), *Escherichia coli* (5,45%), *Arcanumbacterium pyogenes* (3,65%), *Enterococcus spp.* (3,65%), *Staphylococcus aureus* (1,81%), *Proteus vulgaris* (1,81%). Enquanto na Tabela 4, verifica-se que a associação mais freqüente foi entre *Staphylococcus coagulase negativa* e *Clostridium ulcerans* 40,0% (6/15), seguida de *Staphylococcus coagulase negativa* e *Streptotoccus bovis* 20% (3/15).

De modo geral, os microrganismos isolados com maior freqüência foram: *Staphylococcus coagulase negativa* (28,25%), *Streptotoccus bovis* (27,05%), *Clostridium ulcerans* (22,35%) e *Staphylococcus intermedius* (8,27%), conforme Tabela 5. Estudos revelam que das bactérias encontradas como agentes de mastite, a prevalência maior foi *Staphylococcus coagulase negativo*, seguida do *S. aureus* e do *Streptococcus spp.* (Moroni et al., 2005).

Resultados que corroboram com os encontrados por Neves et al, 2010, que também observaram que os SCN foram as bactérias mais frequentes em mastite subclínica de cabras da região da Paraíba, concordando também com os resultados obtidos anteriormente em outros trabalhos que afirmam que os SCN são os principais agentes isolados na mastite subclínica em caprinos (Mota, 2008; Shimidt, et al., 2009; Neves, et al., 2010; Cavalcante et al., 2013, Silva et al., 2013). Essas bactérias apresentam importância epidemiológica, pois podem causar mastite subclínica durante toda a lactação ou mesmo no período seco (Poutrel et al. 1997), tornando os animais infectados fontes de infecção em potencial no rebanho. Some-se a isso a importância econômica desses agentes, que causam prejuízos aos produtores principalmente devido à redução na produção de leite (Leitner et al. 2004).

Estudando a mastite subclínica caprina na região, Bianchini et al. (2010), constataram que a bactéria mais isolada foi *Staphylococcus spp*, com 84,44% dos isolados. Tais achados chamam atenção para importância de práticas que permitam a obtenção higiênica do leite, como higienização adequada

do teto, realização do pré e pós ‘*dipping*’ e da prática conhecida como linha de ordenha, uma vez que, a doença pode ser transmitida de um animal infectado a outro sadio especialmente no momento da ordenha.

### Conclusão

Na região semiárida paraibana observou-se a presença de mastite subclínica e o seu principal patógeno foi o *Staphylococcus* coagulase negativa. Fazer limpeza frequente nas instalações, isolar animais doentes, possuir sala de ordenha e higienização dos tetos antes da ordenha foram os maiores riscos associados à infecção da glândula mamária. Verifica-se que embora os criadores indiquem aplicar medidas higiênicas não está refletindo na saúde das cabras bem como, na qualidade do leite. Assim, é necessário realizar um trabalho de conscientização e treinamento em boas práticas de ordenha na região, melhorar a assistência técnica prestada aos criadores de modo que eles adotem medidas de controle da mastite em cabras leiteiras, a fim de obter leite de melhor qualidade.

### Agradecimentos

Esse estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe.

### Referências bibliográficas

- ALMEIDA, J.F.; AQUINO, M.H.C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; M.L. BARRETO. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de minas gerais e Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.1, p.13-18, 2013. DOI: 10.1590/S1808-16572013000100003.
- ANDERSON, D.E.; HULL, B.L.; PUGH, D.G. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D.G. (Ed.). **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. p.379-399.
- BERGONIER, D. RÉMOUX, R.de C. , UPP, R.R., L AGRIFFOUL, G, B ERTHELOT ,X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, 689-716, 2003. DOI: 10.1051/vetres:2003030.
- BIANCHINI, S.; SILVA, L.B.G.; SILVA, A.P; LIMA, J.C.O.; FALCÃO, D.P. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. **Medicina Veterinária**, Recife, v.4, n.1, p.1-5, 2010.
- BOLSANELLO, R. X.; HARTMAN, M.; DOMINGUES, P. F.; AMILTON SOUZA DE MELLO JÚNIOR; HELIO LANGONI. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedade de Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.221-227, 2009.
- BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B., COSTA, E.O.; COELHO, K. O.; COUTO, D. V. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da

mastite bovina isolados na região de Pirassununga, SP, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, p. 33-44, 2003.

CAVALCANTE, M.P.; ALZAMORA FILHO, F.; ALMEIDA, M.G.Á.R.; SILVA, N.S.; BARROS, C.G.G., SILVA, M.C.A. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.80, n.1, p.19-26, 2013. DOI: 10.1590/S1808-16572013000100004.

CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; SANCHEZ, A.; SIERRA, D. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal Dairy Science**, v.80, n.2815-2819, 1997. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76245-3.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J. GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**. v.68 p.145-153. 2007.

COUTINHO, D.A.; COSTA, J.N.; RIBEIRO, M.G.; TORRES, J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.7 p.139-151. 2006.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, 2004. DOI: 10.1590/S0103-84782004000400058.

GOMES, V.; MATAZO, M.P.; SILVA, C.P.C, BALDACIM, V.A.P.; NOVO, S.M.F.; BACCILI, C.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Etiologia e fatores de risco para a infecção mamária de cabras leiteiras do estado de São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2551-2562, 2014.

LANGONI, H., DOMINGUES, P. F., BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. **Journal Dairy Science**. v.87, p.1719–1726. 2004.

MELO, D.B. Mastite subclínica em cabras no semiárido paraibano. 2012. 59p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P.J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in italian dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**, v.69, p.163-173, 2005.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, p.57-61, 2008.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8a ed. Washington: ASM Press, 2004, 1212p.

NEVES, P.B., MEDEIROS, E. S., SÁ, V. V.; CAMBOIM, E. K.A., GARINO JR, F., MOTA, R.A.;

- AZEVEDO, S. S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.379- 384 2010. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000500001.
- OLECHNOWICZ, J. JAŚKOWSKI, J. M. Mastitis in small ruminants. Review article (Review). **Medycyna Weterynaryjna**, v.2, p.67-72, 2014.
- PEIXOTO, R. M.; MOTA R. A.; COSTA, M. M. da. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, 754-762. 2010. DOI:10.1590/S0100-736X2010000900008.
- PEREIRA, P.F.V.; STOTZER, E. S.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E.T E.; LISBÔA, J.A.N. Fatores de risco, etiologia e aspectos clínicos da mastite em ovelhas de corte no Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34 p.1-10. 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000100001.
- PERRIN, G.G.; MALLEREAU, M.P.; LENFANT, D.; BAUDRY, C. Relationships between California Mastitis Test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.26, n.1-2, p.167-170, 1997.
- POUTREL B., CRÉMOUX R., DUCCELLIEZ M., VERNEAU D. Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts. **Journal Animal Science**. V.75 p.566-570. 1997.
- QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London. 1994.648p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY C.C.; HINCHCLIFF K.W.; CONSTABLE P.D. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10 ed. Elsevier: Spain. , 2007, 2156p.
- SAS Institute Inc. Base SAS version 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2013.
- SILVA, E.R. ; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103-107, 2005. DOI:10.1016/j.vetmic.2004.12.005.
- SILVA, J.G. Etiologia das Mastites em Cabras e Ovelhas de Raças Naturalizadas Criadas no Semiárido Nordeste. **Medicina Veterinária**, Recife, v.7, n.2, p.26-31, 2013.
- SCHMIDT, V.; PINTO, A. T.; SCHNEIDER, R.N.; SILVA, F. F.P.; MELLO, F.A. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.29, p.774-778, 2009. DOI: 10.1590/S0100-736X2009000900015.
- UDO, E. E.; AL-BUSTAN, M. A.; JACOB, L. E. ; CHUGH, T. D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal Medical Microbiology**. 48, 819-823, 1999. DOI: 10.1099/00222615-48-9-819.

**Tabela 1.** Análise univariada dos fatores de risco associados à mastite caprina em rebanhos do semiárido Paraibano.

Variáveis	Isolamento microbiológico		OR	Intervalo de confiança		P
	Positivo			95%		
	N	%		Menor	Maior	
Caprinocultura é atividade principal			-	-	-	NS*
Sim	41	56,2				
Não	74	65,5				
Tipo de criação			-	-	-	NS
Semi-intensiva	98	59,0				
Intensiva	17	85,0				
Tipo de exploração			0,264	0,127	0,546	0,0003
Leiteira	78	58,6				
Mista	37	69,8				
Faz limpeza frequente nas instalações			4,733	2,965	7,556	<0,0001
Sim	52	86,7				
Não	63	50,0				
Isola animais doentes			4,733	2,965	7,556	<0,0001
Sim	74	58,7				
Não	41	68,3				
Esteriliza material de aplicação de medicamento			1,808	1,180	2,770	0,0065
Sim	75	66,4				
Não	40	54,8				
Possui sala de ordenha			3,804	2,382	6,076	<0,0001
Sim	88	73,3				
Não	27	41,0				
Higieniza sala e utensílios de ordenha			2,698	1,765	4,123	<0,0001
Sim	62	68,9				
Não	43	51,1				
Trata quando observa alteração no teto			0,335	0,214	0,525	<0,0001
Sim	48	80,0				
Não	67	53,2				
Trata quando observa alteração no leite			0,216	0,139	0,338	<0,0001
Sim	80	80,0				
Não	35	40,7				
Higienização nos tetos antes da ordenha			3,804	2,382	6,076	<0,0001
Sim	88	73,3				
Não	27	40,9				
Faz uso de pré e pós dipping			4,368	2,067	9,230	0,0001
Sim	19	95,0				
Não	96	57,8				
Faz secagem da cabra			1,514	0,997	2,300	0,05
Sim	72	67,9				
Não	43	53,7				

OR= Odds ratio, \* não significativo, - não calculado



**Tabela 2-** Associação de achados microbiológicos e o teste CMT e associação de achados microbiológicos e o da caneca amostras de leite de cabras, no semiárido paraibano

CMT	Microbiológico		Total N (%)
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	
-	40 (10,7)	47 (12,6)	87 (23,3)
+	47 (12,6)	75 (20,2)	122 (32,8)
++	65 (17,5)	62 (16,7)	127 (34,2)
+++	13 (3,5)	23 (6,2)	36 (9,7)
Total N (%)	165 (44,3)	207 (55,7)	372 (100,0)
Caneca			
-	160 (43,0)	206 (55,4)	366 (98,4)
+	4 (1,1)	2 (0,5)	6 (1,6)
Total N (%)	164 (44,1)	208 (55,9)	372 (100,0)

**Tabela 3** - Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em cultura pura de amostras de leite de cabras com mastite subclínica, no semiárido paraibano.

<b>Microrganismos</b>	<b>FA</b>	<b>FR(%)</b>
<i>Streptotoccus bovis</i>	16	29,10
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	14	25,45
<i>Clostridium ulcerans</i>	12	21,81
<i>Staphylococcus intermedius</i>	4	7,27
<i>Escherichia coli</i>	3	5,45
<i>Arcanumbacterium pyogenes</i>	2	3,65
<i>Enterococcus spp.</i>	2	3,65
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,81
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1,81
<i>Total</i>	55	100

**Tabela 4** - Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em associação de amostras de leite de cabras com mastite subclínica, no semiárido paraibano.

<b>Microrganismos</b>	<b>FA</b>	<b>FR(%)</b>
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Clostridium ulcerans</i>	6	40,00
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Streptotoccus bovis</i>	3	20,00
<i>Staphylococcus intermedius</i> + <i>Streptotoccusbovis</i>	2	13,36
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> + <i>Arcanumbacterium pyogenes</i>	1	6,66
<i>Staphylococcus intermedius</i> + <i>Clostridium ulcerans</i>	1	6,66
<i>Streptotoccus bovis</i> + <i>Enterococcus sp.</i>	1	6,66
<i>Streptotoccus bovis</i> + <i>Klebsiela sp.</i>	1	6,66
<i>Total</i>	15	100,0

**Tabela 5** - Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados em cultura pura e em associação de amostras de leite de cabras com mastite subclínica no semiárido paraibano.

<b>Microrganismos</b>	<b>FA</b>	<b>FR(%)</b>
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	24	28,25
<i>Streptotoccus bovis</i>	23	27,05
<i>Clostridium ulcerans</i>	19	22,35
<i>Staphylococcus intermedius</i>	7	8,25
<i>Escherichia coli</i>	3	3,52
<i>Enterococcus spp.</i>	3	3,52
<i>Arcanumbacterium pyogenes</i>	3	3,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,18
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1,18
<i>Klebsiela sp.</i>	1	1,18
Total	85	100,0

## **CAPITULO II**

### **IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA PROVENIENTE DE LEITE CAPRINO POR PCR**

Este manuscrito está formatado de acordo com as normas do periódico  
**Pesquisa Agropecuária Brasileira**

## **Identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa extraído diretamente do leite caprino por PCR**

Carlos Ticiano Coutinho Ramos<sup>(1)</sup>, Suzana Aparecida Costa de Araújo<sup>(2)</sup>, Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões<sup>(3)</sup>, Arnaldo Santos Rodrigues Junior<sup>(3)</sup>, Silvio Gomes dos Santos<sup>(3)</sup>,  
Leandro Eugenio Cardamone Diniz<sup>(3)</sup> e Kênia Moura Teixeira<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-PPGCAn da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. Instituto Nacional do Semiárido-INSA. Av. Francisco Lopes de Almeida, 58434-700, Campina Grande, PB, Brasil. ticianoramos@hotmail.com. <sup>(2)</sup> Departamento de Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, 58397-000, Areia, PB. suzanaaraujo@gmail.com. <sup>(3)</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros Av. Beira Mar, 3250 Jardins, 49025-040, Aracaju, SE. tania.dantas@embrapa.br, juuniorjr@bol.com.br, silvio.santos@embrapa.br, leandro.diniz@embrapa.br, kenia.teixeira@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi padronizar um diagnóstico molecular, da mastite subclínica utilizando PCR, para identificação de *Staphylococcus spp.* direto de leite caprino, bem como, Identificar a presença de ECN resistente a metilicina ou com produção de biofilme. Após o resultado do microbiológico, somente as 24 amostras de leite que apresentaram *Staphylococcus* coagulase negativa provenientes de isolados de mastite caprina no estado da Paraíba, foram encaminhadas ao laboratório de Biologia molecular da mesma instituição para a extração de DNA diretamente do leite. O uso da PCR para identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa utilizando o DNA obtido pela extração baseada em fenol-cloroformio não foi eficiente. Baseado neste estudo pode-se buscar melhores condições de extração e primers mais específicos para a identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa.

**Termos de indexação:** gene 16sRNA, gene ica, leite de cabra, mastite caprina, PCR.

**Coagulase negative *Staphylococcus* identification extracted directly from goat milk by**

## PCR

**Abstract:** The objective of this study was to standardize a molecular diagnosis of subclinical mastitis using PCR for identification of *Staphylococcus* spp. Direct goat milk as well as to identify the presence of methicillin-resistant CNS or biofilm production. After the result of microbiological, only 24 milk samples showed that coagulase negative *Staphylococcus* isolates from goats mastitis in the state of Paraíba, were sent to the molecular biology laboratory of the same institution for DNA extraction directly from milk. The use of PCR for identification negative *Staphylococcus* coagulase obtained by using DNA extraction based on phenol-chloroform was not effective. Based on this study can seek best extraction conditions and more specific primers for the identification of coagulase negative *Staphylococcus*.

**Index terms:** 16sRNA gene, ica gene, goat milk, caprine mastitis, PCR.

## Introdução

A Mastite é uma dos mais comuns problemas de saúde que afetam caprinos e são usualmente ocasionadas por bactéria gram positiva, mais comumente *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Marogna et al., 2010). Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre os principais agentes etiológicos da mastite caprina (Dogruer et al., 2010). Vários relatos indicam que o *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) são os mais prevalentes em casos de mastite subclínica de ovinos e caprinos, variando de 25% a 93% (Bergonier et al., 2003).

O grupo dos SCN compreende cerca de 40 espécies e subespécies (Bannerman, 2003), cuja identificação completa depende de muitos testes fenotípicos ou de testes moleculares, nem sempre disponíveis na rotina do diagnóstico microbiológico. Entretanto, apesar do reconhecido papel dessa bactéria como maior causadora de infecções intramamárias em

pequenos ruminantes, a patogenicidade de diferentes espécies de SCN é variável. Esta patogenicidade também é associada à aderência, pois estes microrganismos têm grande poder de adesão, produção de enzimas extracelulares e toxinas capazes de provocar níveis elevados de lesão tecidual (Mota, 2008). A maioria das espécies de SCN, comumente isoladas de mastite subclínica em cabras e ovelhas são *Staphylococcus epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. xylosus* (Bergonier et al., 2003).

Vários alvos genômicos tem sido usados para a identificação de espécies de SCN, incluindo o 16SRNA (Heikens et al., 2005), o ITS (Couto et al., 2001), gap (Yugueros et al., 2000), groEL (Kwok et al., 1999), sodA (Poyart et al., 2001), femA (Vannuffel et al., 1999), tuf (Martineau et al., 2001) andrpoB (Drancourt and Raoult, 2002).

O *icaA* representa atividade catalítica *N*-acetilglicosaminatransferase e que sozinha tem baixa atividade transferase mas, quando é co-expressa com *icaD*, apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de 1,6-*N*-acetilglicosamina (Gotz, 2002).

Os SCN, podem apresentar elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, tais como a oxacilina (Michelin et al., 2005), com a possibilidade de possuírem uma proteína ligadora de penicilina, com baixa afinidade em relação aos  $\beta$ -lactâmicos, codificada pelo gene *mecA*. A resistência intrínseca para este antibiótico é atribuída pela presença de *mecA*, cujo produto é uma proteína de 78kDa chamada de proteína ligada a penicilina (Utsui e Yokota, 1985).

O gene *femA* codifica uma proteína precursora a qual tem um papel na biossíntese do peptidoglicano em *S. aureus* e é também considerado como um fator influenciando o nível de resistência a meticilina. Um gene homólogo ao *femA* foi caracterizado em *S. epidermidis* o que implica na possibilidade do *femA* ser uma região filogenética conservada em espécies de *Staphylococcus spp.* (Vannuffel et al, 1999).

Em virtude da existência de *S. aureus* resistente ao antibiótico meticilina (cepas MRSA) e



casos de SCN também resistente a meticilina (Mattos et al., 2003), principalmente em isolados de hospitais, resolvemos estudar se nos isolados de SCN do leite de caprino alguma cepa apresentaria resistência a meticilina.

O objetivo deste trabalho foi padronizar um diagnóstico molecular, da mastite subclínica utilizando PCR, para identificação de *Staphylococcus sp.* direto de leite caprino, bem como, Identificar a presença de ECN resistente a meticilina ou com produção de biofilme.

## **Material e Métodos**

### **Isolamento Bacteriano**

Foram avaliadas 372 amostras de leite de cabra obtidas em propriedades do cariri da Paraíba em janeiro de 2014. Antes da coleta das amostras foi realizado o teste da caneca e o CMT. Estas amostras foram primeiramente submetidas ao teste microbiológico de acordo com Brito e Brito, (1999) no laboratório de sanidade animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Após o resultado do microbiológico, somente as 24 amostras de leite que apresentaram *Staphylococcus* coagulase negativa foram encaminhadas ao laboratório de Biologia molecular da mesma instituição para a extração de DNA diretamente do leite.

### **Extração de DNA bacteriano**

O DNA foi extraído diretamente do leite de acordo com o protocolo de Rodrigues Junior et al., (2014).

### **Reações de PCR**

Os fragmentos contendo os genes de interesse foram amplificados, a partir de DNA genômico de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas, por PCR utilizando-se os primers específicos para a amplificação dos genes em estudo. Os primers utilizados para identificação dos *Staphylococcus spp.* estão descritos no quadro 1.

O protocolo de PCR empregado para o gene *femA* foi baseado nos trabalhos de Silva e Silva (2005) e Silva (2008). Para análise do gene *mecA*, foi utilizada o protocolo descrito por Dias et al., (2011). Para amplificação do 16S rDNA utilizou o par de primer universal 968 E 1401r (Quadro 1) e o protocolo de Becker (2004).

### **Eletroforese em gel de Agarose**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,1 µg/L de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 0,1 mM EDTA), a 100 V e 400 A por 50 minutos. Os produtos foram visualizados sob iluminação de luz ultravioleta.

## **Resultados e Discussão**

Das 372 amostras analisadas apenas 24 apresentaram no isolamento microbiológico apenas bactérias *Staphylococcus* coagulase negativa e estas foram encaminhadas para a análise molecular. Das 24 amostras, seis (25%) apresentaram CMT negativo e foram positivos no isolamento microbiológico e duas (8,33%) amplificaram banda na PCR para o 16sRNA (Quadro 2).

Resultados similares foram encontrados por Melo, 2012 estudando mastite em cabras na Paraíba, demonstrando que o CMT não é um teste diagnóstico satisfatório para validar infecções intramamárias em caprinos. Um baixo escore do CMT tem sido sugerido como bom indicador de ausência de infecção intramamária em cabras, entretanto, um alto escore nem sempre indica infecção nesta espécie animal (Perrinet al., 1997), uma vez que as células epiteliais reagem ao CMT juntamente com os leucócitos, causando uma interpretação diferente da usada para bovinos (Perrinet al., 1997).

Neste estudo utilizou os genes *icaA*, *icaD*, *femA*, *mecA*, e o 16sRNA. O *icaA* juntamente com o grupamento *ica* é responsável pela formação de biofilme.

Das 24 amostras apenas sete amplificaram no PCR utilizando os oligonucleotídeos para o

gene 16sRNA (figura1). Resultados similares foram encontrados por Clements et al., (2008). Que obtiveram um baixo percentual de reações positivas para a amplificação do gene GAPDH (54,34%). O baixo índice de pureza ( $<1,6$ ) encontrado em grande parte das amostras analisadas provavelmente contribuiu para a inibição da PCR. Os índices observados podem ser decorrentes da contaminação por proteínas e/ou resíduos de reagentes dos métodos de extração.

Com os avanços e estudos de novas técnicas moleculares voltadas a detecção, identificação ou caracterização microbiológica, a tipagem molecular tem se difundindo amplamente, assim, metodologias baseada em PCR para amplificação de pequenas quantidades de DNA alvo foi desenvolvida com sucesso, conduzindo uma revolução nas técnicas de diagnóstico laboratorial. Apesar do enorme avanço na detecção de agentes infecciosos por tais métodos, algumas limitações foram evidenciadas. Entre elas, a co-extração de fatores inibitórios, bem como as diferenças intra e inter espécies que interferem na extração do DNA genômico bacteriano (Nogueira, 2004).

A quantificação de DNA extraído variou de 26,8 a 821,4 ng/ $\mu$ l com média de 209,90 ng/ $\mu$ l. Um dos aspectos essenciais para obter resultados de testes moleculares com a reprodutibilidade adequada é a integridade do DNA extraído a partir de diferentes fontes.

Diversos fatores necessitam ser analisados e comparados a fim de definir os pontos cruciais para a obtenção de um extraído íntegro, puro e que permita a estocagem, sem que haja degradação do DNA (Caldart et al, 2011).

Em bactérias, um fator adicional que contribui para a complexidade da extração do DNA, reside nas diferenças quanto à composição da parede celular das mesmas. Desse modo, os diferentes protocolos de extração de DNA devem considerar essa importante diferença estrutural bacteriana, principalmente ao planejar a estratégia de obtenção de ácidos nucleicos

celulares. Nessa direção, diferentes metodologias são descritas na tentativa de obtenção de grande quantidade de DNA a partir de bactérias Gram-positivas (G+) e Gram-negativas (G-), com maior ou menor sucesso (Nogueira et al., 2004).

Nenhuma amostra amplificou para os genes *icaA*, *icaD*, *femA* e *mecA*. Arciola et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do biofilme, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de cepas virulentas formadoras de biofilme.

Embora os genes *icaA* e *icaD* simultaneamente não tenham sido encontrados nestas amostras, isso não significa que estes estafilococos isolados não sejam produtores de biofilme, pois a produção de biofilme pode ser mediada por outros genes como o gene *Bap* responsável pela síntese de biofilme em *Staphylococcus aureus* e em algumas espécies de ECNs isolados de casos de mastite (Cucarella et al., 2004)

### **Conclusões**

As reações de PCR para identificar *Staphylococcus coagulase negativa* utilizando os oligonucleotídeos descritos na literatura e a extração de DNA utilizada, não foram eficientes para identificar estas espécies no leite caprino.

### **Agradecimentos**

Esse estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe.

### **Referências**

BANNERMAN T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that

- grow aerobically, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press, Washington, 2003. p.384-404.
- BERGONIER, D., DE CRÉMOUX, R., RUPP R., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**. v.34, p.689-716.2003.
- BERNARDI, A.C.A. **Estudo de amostras de *Staphylococcus coagulase negativa* quanto a formação de biofilme**. 2005.p.144. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara.
- BRITO, P. A. V. E BRITO, J. R. F. Diagnóstico microbiológico da mastite. Juiz de Fora, MG. Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).
- CALDART, E.T.; CHIAPPETTA, E. F.L.; RAVAZZOLO, A.P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**. 39(1):945. 2011.
- CLEMENTS, D.N.; WOOD, S.; CARTER, S.D.; OLLIER, W.E.R. Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. **Research in Veterinary Science**. 85(1): 74-79. 2008.
- COUTO, I., PEREIRA, S., MIRAGAIA, M., SANTOS SANCHES, I., DE LENCASTRE, H., Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.3099–3103, 2001.
- CUCARELLA, C., TORMO, M., ÚBEDA, C., TROTONDA, M., MONZÓN, PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I., PENADÉS, J. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.72, p. 2177–2185, 2004.
- DIAS, N.L. ; SILVA, D.C.B. ; OLIVEIRA, D.C.B.S.; FONSECA JUNIOR, A.A.; SALES, M.L. ; SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite . **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

- DOGRUER G., SARIBAY M.K., ERGUN Y., ASLANTAS O., DEMIR C., ATES C.T., Treatment of subclinical mastitis in Damascus goats during lactation. **Small Ruminant Research**. 90, 153-155, 2010.
- DRANCOURT, M., RAOULT, D., *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p.1333–1338, 2002.
- GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**. v.43, p.1367–1378, 2002.
- HEIKENS, A., FLEER, A., PAAUW, A., FLORIJN, A., FLUIT, A.C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, p.2286–2290, 2005.
- KWOK, A.Y.C., SU, S.C., REYNOLDS, R.P., BAY, S.B., AV-GAY, Y., DOVICH, N.J., CHOW, A.W. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequence within the genus *Staphylococcus*. **International journal of systematic bacteriology**. v.49, p.1181–1192, 1999.
- LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.6489-6494, 2003.
- MAROGNA, G., ROLESU, S., LOLLAI, S., TOLA, S., LEORI, G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. **Small Ruminant Research**. v. 88, p.119–125. , 2010.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., KE, D., PARADIS, S., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.2541–2547, 2001.
- MATTOS, E.M.; TEIXEIRA, L.A.; ALVES, V.M.; REZENDA, R.C.A.; DA SILVA, C.M.V.;

DA SILVA, C.M.C.; CARVALHO, F.B.T.; FIGUEIREDO, A.M. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of *Staphylococcus epidermidis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 45, p.13-22, Jan. 2003.

MELO, D.B. Mastite subclínica em cabras no semiárido paraibano. 2012. 59p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

MICHELIN, L.; LAHUDE M.; ARAÚJO, P.R.; GIOVANAZ, D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE, A.P.L.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.17-23, 2005.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p.57-61, 2008.

NOGUEIRA, Carla Ariane Minatel et al. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 6, n. 2, 2004.

PERRIN, G.G.; MALLEREAU, M.P.; LENFANT, D.; BAUDRY, C. Relationships between California Mastitis Test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.26, n.1-2, p.167-170, 1997.

POYART, C., QUESNE, G., BOUMAILA, C., TRIEU-CUOT, P., Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.4296-4301, 2001.

RODRIGUES JUNIOR, A.S., SANTOS, S.G., VITORIA, M.F., TEIXEIRA, K.M., SIMOES, T.V.M.D., DINIZ, L.E.C., OLIVEIRA, A.A. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA do *S. aureus* diretamente do leite contaminado. In: V Seminário de iniciação científica e pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, **ANAIS...** IV Seminário

de iniciação científica e pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014p. 224-232.

SILVA, E.R. ; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103-107, 2005. DOI:10.1016/j.vetmic.2004.12.005.

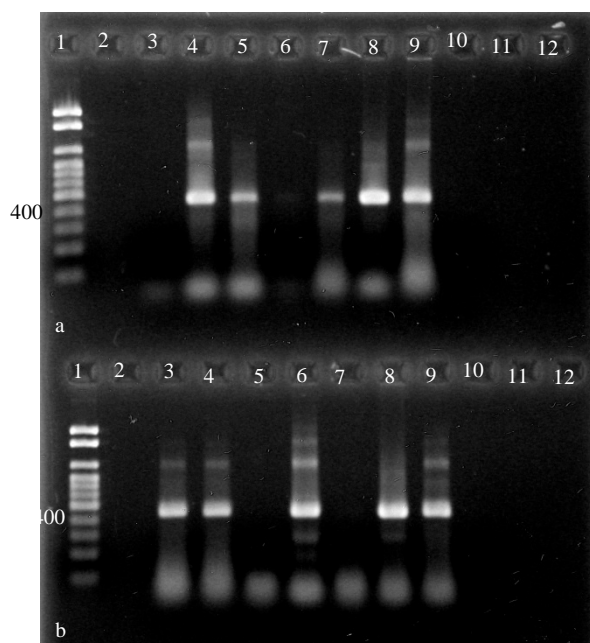
SILVA, J.G. Etiologia das Mastites em Cabras e Ovelhas de Raças Naturalizadas Criadas no Semiárido Nordeste. **Medicina Veterinária**, Recife, v.7, n.2, p.26-31, 2013.

UTSUI, Y., AND YOKOTA, T.Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 28 p.397–403,1985.

VANNUFFEL, P., HEUSTERSPREUTE, M., BOUYER, M., VANDERCAM, B., PHILIPPE, M., GALA, JL. Molecular characterization of femA from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and femA based discrimination of staphylococcal species. **Research In Microbiology**; 150:129-41.1999.

YUGUEROS, J., TEMPRANO, A., BERZAL, B., SANCHEZ, M., HERNANZ, C., LUNGO, J.M.,NAHARRO, G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene as a use ful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.4351–4355, 2000.





**Figura 1-** Gel de eletroforese do produto da PCR utilizando primers 16sRNA, a.1 - Marcador de 100 bp - Norgen 11500 2 vazio, 3- amostra 9d, 4- amostra 59d, 5- amostra 39E, 6- amostra 45E, 7- amostra 142E, 8- amostra BHI, 9- branco "água ultrapura + Mix", 10- branco "só água ultrapura" , 11 – vazio 12-vazio. b. 1 - Marcador de 100 bp - Norgen 11500, 2- vazio, 3- amostra 9d, 4- amostra 59d, 5- amostra 39E, 6- amostra 45E, 7- amostra 142E, 8- amostra BHI, 9- branco "água ultrapura + Mix" ,10- branco "só água ultrapura", 11 – vazio, 12- vazio.

#### **Quadro 1 - Primers utilizados no estudo**

Nome do primer	Sequência (5-3)	Tamanho do fragmento	Gene alvo	Referência
icaA	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA CCCAGTATAACGTTGGATACC	188	IcaA	Bernardi (2005)
icaD	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198	IcaD	Bernardi (2005)
9681401 R	AAC GCG AAG AAC CTT AC CGG TGT GTA CAA GAC CC	433	16s	Becker (2004)
mecA	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533	mecA	Lee (2003)
femA	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	femA	Mehrotra et al. (2000)

**Quadro 2-** Associação dos resultados encontrados no CMT, caneca, microbiológico e PCR

## 16SrDNA

<b>Amostras</b>	<b>CMT</b>	<b>Caneca</b>	<b>Microbiológico</b>	<b>PCR 16S</b>
9d	+	-	+	
24d	++	+	+	
36d	-	-	+	
46d	++	-	+	+
59d	-	-	+	
83d	+	-	+	
129d	++	-	+	
142d	++	-	+	
4e	+	-	-	+
5e	-	-	+	
6e	++	-	+	
14e	++	-	+	+
39e	+	-	+	
40e	-	+	+	+
45e	-	-	+	+
52e	++	-	+	
116e	+++	-	+	
122e	+	-	+	
125e	+	-	+	+
130e	++	-	+	
131e	+	-	+	+
139e	-	-	+	
142e	++	-	+	
189e	+++	-	+	

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA L.A.B. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 104p. 2004. **(Dissertação de Mestrado)**.

ANDERSON, D. E.; HULL, B. L. ; PUGH, D. G. Enfermidades da glândula mamária . In: PUGH, D. G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. 1. ed. São Paulo : Roca , p. 379-399. 2005.

BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y.; LANCE, S.E.; HEIDER, L.E. Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 12, p.59- 71, 1992.

BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., SCHUMANN P., PETERS G. & VON EIFF C. Development and evaluation of a qualitycontrolled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.** 42(11):4988-4995. 2004.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, 689-716, 2003.

BJORLAND, J. et al. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among *Staphylococci* of bovine and caprine origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4363-4368, 2005.

BURGOS, F. R. N. F. Mastectomia radical e unilateral no tratamento de mastite gangrenosa em cabras. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009, 64p. **(Dissertação de Mestrado)**.

CONTRERAS, A., LUENGO, C., SANCHEZ, A., CORRALES, J.C., The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livest. Prod. Sci.** 79,273-283.2003.

CHAPAVAL, L., DE SOUZA OLIVINDO, C., DE SOUSA, F. G. C., ALVES, F. S. F., & FROTA, I. M. A. Detecção de *Streptococcus spp.* Utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 309-320, 2006.

CHAPAVAL, L.; AGUIAR, V. M. P.; VIANA, G. A.; SOUSA, A. P. B. de; MORORÓ, A. M.; MIRANDA, K. P. de; MAGALHÃES, D. C. T.; PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L. de. **Controle dos casos de mastite e da artrite encefalite caprina com a utilização de boas práticas agropecuárias: uso de procedimentos operacionais e instruções de trabalho no setor leiteiro da Embrapa caprinos e ovinos.** Embrapa, 2009. 18p. (Documentos) Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/admin/pdf/0200012013.doc86.pdf>> Acesso em: 04 jan. 2015.

CHAPAVAL, L., OLIVINDO, C. DE S., SOUZA, F. G. C. DE, ALVES, F. S. F. & FROTA, I. M. A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonasaeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **ComunicataScientiae**, 49, 2010.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-153, 2007.

DA SILVA, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., da Silva, N., Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Rumin. Res.** 55, 45-49.2004.

DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. **(Tese de Doutorado)**.

GONI P., VERGARA Y., RUIZ J., ALBIZU I., VILA J. & GOMEZ-LUS R. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 23:268-272. 2004.

GUIMARÃES, V.P., FACÓ, O. BONFIM, OLIVEIRA, E.L. Sistema de produção de leite de cabra no Semiárido Nordeste. **In:** 4º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte. João Pessoa-PB. 2009.

HALL, S.M., RYCROFT, A.N. Causative microorganisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. **Vet. Rec.** 160 (January (1)), 19-22. 2007.

HOLANDA JÚNIOR, E.V., MEDEIROS, H.R., DAL MONTE, H.L.B., COSTA, R.G., PIMENTA FILHO, E.C. Custo de produção de leite de cabra na região nordeste. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA. João Pessoa-PB. 2008.

LANGONI, H. et al. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

MAVROGIANNI V.S., ALEXOPOULOS C. & FTHENAKIS G.C. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of caprine mastitis. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** 27:373-375. 2004.

MORONI, P., VELLERE, F., ANTONINI, M., PISONI, G., RUFFO, G., CARLI, S., Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Int. J. Antimicrob. Agents** 23, 637-640. 2004.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; SÁ, V.V.; CAMBOIN, E.K.A.; GARINO JÚNIOR, F.; MOTA, R.A.; AZEVEDO, S.S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco asso-

ciados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.379- 384, 2010.

NOLTE F.S. & CALIENDO A.M. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press, Washington. 2003.

OLDE REIKERINK, R.G.; BARKEMA, H.; KELTON, D.; SCHOLL, D. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1366-1377, 2008.

OLIVINDO, C. de S. *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* using the REP-PCR technique to monitor goat milk quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**.38, 1317-1321, 2009.

OLECHNOWICZ, J. JAŚKOWSKI, J. M. Mastitis in small ruminants. Review article (Review). **Medycyna Weterynaryjna**, v.2, p.67-72, 2014.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; SOUZA JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.; COSTA, M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.735-740, 2010.

PEIXOTO, R.M.; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, M. B.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOTA, R.A.; COSTA, M.M. Fatores de Risco para Mastite Subclínica em Cabras Leiteiras Criadas no Estado da Bahia. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v.13, n.1, p.135-140, 2011. DOI: 10.15528/2176-4158/rcpa.v13n1p135-140

PEIXOTO, R.M. AMANSO, E.S., CAVALCANTE, M.B., AZEVEDO, S.S., PINHEIRO JUNIOR J.W., MOTA, R.A., COSTA, M.M. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.101-105, jan./mar., 2012.

PYORALA,S. New strategies to prevent mastites. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v.37, n-4, p.211-216,2002.

ROSA, Juliana de Oliveira. Detecção de gene mecA em estafilococos coagulase negativa resistentes a oxacilina isolados da saliva de profissionais da saúde de um Hospital Universitário. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008. **(Dissertação de mestrado)**.



## **ANEXOS**

## NORMAS DA REVISTA SEMINA

### Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. Material e Métodos... *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1.Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2.Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3.Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4.Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.:  $\text{kg ha}^{-1}$ . Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.:  $\text{kg/ha}$ .
- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades,  $\text{g L}^{-1}$ , e não  $\text{g.L}^{-1}$  ou  $\text{gL}^{-1}$ .

e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

#### 8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que .....
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...] comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

#### Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

#### Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

## **NORMAS DA REVISTA PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA - PAB**

### Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

### Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que compoñham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO .

### Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.



## Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

## Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

### Referências

- A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. Anais.Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). O

agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

#### - Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

#### - Teses

HAMADA, E. Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

#### - Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

#### Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

#### Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

#### Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

### Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.



**Modelo do questionário sobre aspectos sócio-econômicos e  
epidemiológico aplicado nas propriedades amostradas**

Questionário nº _____
<b>DADOS DA PROPRIEDADE</b>
Nome da Propriedade: _____ Coordenadas Geográficas: _____ Endereço: _____ Distrito/Localidade _____ Município _____ UF _____ Área: _____ ha Tipo do terreno: (0) plano (1) alagado (2) acidentado
<b>I-DADOS DO CRIADOR</b>
1. Idade do criador: _____ anos 2. Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) Viúvo 3. Nível educacional: (0) Não estudou (1) Primário incompleto (2) Primário completo (3) Secundário incompleto (4) Secundário completo (5) Profissionalizante (6) Superior 4. Já realizou algum curso ou treinamento em caprino-ovinocultura? (0) não (1) sim 5. Pertence a algum tipo de associação? (0) não (1) sim, a cooperativa local (2) sim, outra (3) _____ 6. Esta é sua ocupação principal? (0) Não (1) Sim 6.1. Possui outra ocupação? (0) Não (1) Sim: _____ 7. Você ou outra pessoa da família ou trabalhadores já sofreram de alguma doença relacionada à criação de animais? (0) Não (1) Sim
<b>II-CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CRIAÇÃO</b>
8. Identificação do Rebanho: (0) Não (1) Sim 9. Tipo de Marcação: (1) Brinco (2) Medalha (3) Corte na Orelha (4) Tatuagem (5) Outro _____ Composição do Rebanho Caprino Anglo-Nubiana (1) Toggenburg (2) Murciana (3) Saanen (4) Alpina (5) Boer (6) Mestiça (7) SRD

## 10. Tamanho do Rebanho

Cabritos (< 1 ano):	Ovinos:
Cabras:	Bovinos:
Reprodutores:	
Rufião:	

Compartilha reprodutor com outros criadores? (0) Não (1) Sim

11. Raça predominante: \_\_\_\_\_

12. Tipo de produção: (1) Carne (2) Leite (3) Mista

13. Tipo de manejo: (0) Nenhum/outro (1) Intensivo (preso dia e noite)

(2) Semi-extensivo (pasto + preso) (3) Extensivo (solto maior parte do tempo)

14. Tipo de pasto: (0) Não tem pasto (1) Nativo (2) Planta capim

15. Nível da produção:

a. Quantas cabras estão em lactação? \_\_\_\_\_

b. Média de produção por cabra? \_\_\_\_\_

c. Litros de leite por ano: \_\_\_\_\_

d. Número de animais vendidos/abatidos por ano: \_\_\_\_\_

16. Tempo na atividade: \_\_\_\_\_

17. Tipo de Aprisco: (0) Chão Batido (1) Ripado (2) Cimentado (3) Outro \_\_\_\_\_

18. Frequência com que limpa/varre/desinfeta as instalações:

(0) não limpa (1) diário (2) semanal (3) mensal (4) anual

19. Dispõe de serviço veterinário? (0) Não (1) Particular (2) Cooperativa/associação (3) Governo estadual/Federal

20. Empregados na propriedade: (1) Familiares (2) Contratados

21. Tem eletricidade? (0) não (1) sim

21. Fonte de água: (0) não tem (1) açude (2) cacimba/poço (3) companhia de abastecimento

(4) outra Mineralização dos animais: (0) Não (1) Sim /Concentrado: (0) Não (1) Sim Quanto? \_\_\_\_\_

23. Adquiriu fêmea reprodutora de reposição nos últimos 5 anos? (0) Não (1) Sim

24. Adquiriu machos reprodutores de reposição nos últimos 5 anos? (0) Não (1) Sim

25. Qual a origem dos animais adquiridos?

(1) Propriedades vizinhas (mesmo município) (2) Outras propriedades (fora do município) (3) Feiras ou exposições de animais (4) Outros Estados \_\_\_\_\_

## II- MANEJO SANITÁRIO

26. Mortalidade

(0) Não sabe (1) Abaixo de 10% (2) Entre 10 e 20% (3) Entre 20 e 50% (4) Acima de 50%

27. Observou alguma fêmea que não emprenhou no último ano? (0) Não (1) Sim

28. Número de fêmeas que abortaram (entre) no último ano: \_\_\_\_\_

29. Número de borregos/ cabritos que morreram durante o parto: \_\_\_\_\_

30. Número de cabritos/ borregos que morreram antes de 1 mês de vida: \_\_\_\_\_

31. Entre as doenças abaixo, assinale aquelas que ocorrem no rebanho:

a. Conjuntivite: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

b. Pneumonia: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

c. Diarréia: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

d. Helminthoses: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

e. Mal do Caroço: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

f. Mastite: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

32. Vermifugação: (0) Não (1) Sim

33. Permanência mínima de 12 horas após a vermifugação no curral: (0) Não (1) Sim

34. Desinfecção do curral após vacinação e vermifugação: (0) Não (1) Sim

35. Troca anual do vermífugo: (0) Não (1) Sim

36. Faz uso de esterqueiras: (0) Não (1) Sim

37. Vermífuga os animais recém chegados na propriedade: (0) Não (1) Sim

38. Faz quarentenário mesmo dos animais da propriedade após feiras: (0) Não (1) Sim

39. Separa animais jovens de adultos: (0) Não (1) Sim

40. Separa machos de fêmeas: (0) Não (1) Sim

41. Faz descanso de pastagens: (0) Não (1) Sim
42. Enterra ou crema animais mortos com morte natural: (0) Não (1) Sim
43. Os diagnósticos são feitos por técnicos: (0) Não (1) Sim
44. Isola animais doentes: (0) Não (1) Sim
45. Esteriliza material de aplicação de medicamentos: (0) Não (1) Sim
46. Usa seringas e agulhas descartáveis: (0) Não (1) Sim
47. Faz limpeza e desinfecção das instalações: (0) Não (1) Sim
48. Qual frequência? (1) diária (2) semanal (3) quinzenal (4) mensal
49. Adota e cumpre calendário profilático: (0) Não (1) Sim
50. Vacina contra raiva? (0) Não (1) Sim
51. Vacina contra clostridiose? (0) Não (1) Sim

#### **IV. MANEJO SANITÁRIO DA MASTITE**

52. Tem conhecimento da doença? (0) NÃO (1) SIM
53. Sabe como a mastite é transmitida dentro do rebanho? (0) NÃO (1) SIM
54. Sabe o que é linha de ordenha e a importância dessa prática? (0) NÃO (1) SIM
55. Usa a o CMT ou a caneca de fundo escuro? (0) NÃO (1) SIM
56. Sabe interpretar? (0) NÃO (1) SIM
57. Em quais condições é feito o tratamento da mastite?
- (1) quando observa alteração no leite (2) quando observa alteração na teta (3) quando observa reação no CMT (4) orientado pelo técnico
58. Quais os antibióticos que já foram utilizados no tratamento da mastite?
- (1) Gentamicina (2) Florfenicol (3) Amoxicilina (4) Enrofloxacina (5) Neomicina (6) Bacitracina (7) Tetraciclina (8) Penicilina (9) Ampicilina (10) Eritromicina (11) Cloranfenicol (12) Cefalosporina (13) outro
59. Usa algum atualmente? Qual? (1) Gentamicina (2) Florfenicol (3) Amoxicilina (4) Enrofloxacina (5) Neomicina (6) Bacitracina (7) Tetraciclina (8) Penicilina (9) Ampicilina (10) Eritromicina (11) Cloranfenicol (12) Cefalosporina (13) outro
60. Usa bisnaga intramamária pra o tratamento da mastite? (0) Não (1) Sim
- Como é feito?

(1) bisnaga inteira (2) meia bisnaga (3) 1/3 da bisnaga (4) após ordenha (5) higieniza o teto antes de administrar

61. Qual a duração mínima do tratamento da mastite? (1) 1-3 dias (2) 3-5 dias (3) 5-7 dias (4) 7 -10 dias

62. Quando a cabra não apresenta melhora o que você faz?

(1) troca o antibiótico (2) prolonga o tratamento (3) descarta a cabra (4) nada

g. Pododermatite: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

h. Boqueira: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

i. Aborto: (0) não (1) pouco (2) às vezes (3) muito

63. Vermifugação: (0) Não faz (1) Estratégica (2) Tática (3) Supressiva (4) Curativa

#### **V - MANEJO REPRODUTIVO DO REBANHO**

64. Qual o tipo de manejo reprodutivo do rebanho?

(1) Monta natural (2) Monta controlada (3) Inseminação artificial

65. Qual a época (meses) de reprodução/ parição? (0) o ano todo (não controla) (1) controla

66. Quantos cabritos cada fêmea produziu no último ano? (0) Não sabe dizer (1) 1 (2) 2 (3) 3

#### **VI-CARACTERÍSTICAS DA ORDENHA**

67. Local onde é realizada a ordenha? (1) Curral (2) Plataforma de ordenha

68. Utilização do pré e pós-dipping? (0) não (1) sim

69. Presença de moscas no local da ordenha? (0) não (1) sim

70. Higienização da Sala e/ou Equipamento: (0) Não (1) Sim Produto: \_\_\_\_\_

(1) Iodo (2) hipoclorito de sódio (3) digluconato de clorexidina (4) amônia quaternária (5) cloreto de benzalcônio

71. Faz Linha de Ordenha? (0) Não (1) Sim

72. Tratamento Preventivo de Mamites em Cabras Secas: (0) Não (1) Sim

73. Realiza secagem da cabra; (0) Não (1) Sim

74. Caso sim, quais os critério de Secagem da Cabra:

(1) Baixa Produção (2) Período de Lactação (3) Período de Gestação (4) Outro: \_\_\_\_\_

75. Período Médio de Lactação : \_\_\_\_\_ dias

<b>VII- MANEJO DAS CRIAS</b>
76. Administração do colostro: (0) Não (1) Sim
77. Tipo de Colostro Dado às Crias: (1) Vaca (2) Cabra (3) Artificial
78. Tratamento do Colostro: (0) In Natura (1) Pasteurizado (3) Termizado
Possui Banco de Colostro ? (0) Não (1) Sim
79. Aleitamento:(0)Natural (1)Artificial Leite Utilizado no Aleitamento:(1)Cabra (2)Vaca (3)Soja (4)Artificial (5) Outro _____
80. Corte e desinfecção do umbigo: (0) Não (1) Sim